

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-227756

(43)Date of publication of application : 25.08.1998

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/26

G01N 27/27

G01N 27/416

(21)Application number : 09-041428

(71)Applicant : NOK CORP

(22)Date of filing : 12.02.1997

(72)Inventor : GOTO MASAO

(54) MEASURING METHOD FOR CONCENTRATION USING BIOSENSOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To precisely measure concentration of material, by placing pH sensor electrode and a biosensor electrode on one insulating substrate, and selecting calibration curve of the biosensor electrode on the basis of pH derived by a pH sensor electrode.

SOLUTION: An action electrode, a counter electrode, a reference electrode lead, and a reference electrode are formed on an insulating substrate to create a biosensor electrode, and mixed layer of oxidoreductase and electron transmitter is formed on the action electrode, the counter electrode, and the reference electrode. In addition, a pH sensor electrode such as quinhydrone electrode and a reference electrode of silver/silver oxide electrode are arranged on the insulating substrate to form a chloride layer. During measurement of material concentration, pH calibration curve and biosensor calibration curve depending on each pH are previously stored in a measuring device's circuit, and a calibration curve corresponding to a measured pH is selected. Then, output current depending on the material concentration is met with the selected calibration curve, and derived material concentration is output and displayed. Thus, effect from pH of a sample is corrected, and precise material concentration can be measured.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 03.09.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3550675

[Date of registration] 14.05.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-227756

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
G 0 1 N 27/327		G 0 1 N 27/30 3 5 3 R
27/26	3 8 1	27/26 3 8 1 A
27/27		27/46 B
27/416		3 3 8

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平9-41428

(22) 出願日 平成9年(1997) 2月12日

(71) 出願人 000004385

エヌオーケー株式会社

東京都港区芝大門1丁目12番15号

(72) 発明者 後藤 正男

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ

オーケー株式会社内

(74) 代理人 弁理士 吉田 俊夫

(54) 【発明の名称】 バイオセンサによる濃度測定方法

(57) 【要約】

【課題】 バイオセンサを用いる濃度測定方法において、サンプルpHの影響を補正によって排除し、正確な目的物質濃度を測定し得る方法を提供する。

【解決手段】 同一の絶縁性基板上にpHセンサ用電極およびバイオセンサ用電極を設け、pHセンサ用電極で得られたpHでバイオセンサ用電極の検量線を選定し、目的物質濃度を測定する。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 同一の絶縁性基板上にpHセンサ用電極およびバイオセンサ用電極を設け、pHセンサ用電極で得られたpHでバイオセンサ用電極の検量線を選定し、目的物質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサによる濃度測定方法。

【請求項2】 pHセンサ用電極としてキンヒドロロン電極が用いられる請求項1記載のバイオセンサによる濃度測定方法。

【請求項3】 キンヒドロロン電極が作用極および参照極の少なくとも一方の電極上にキンヒドロロンおよび塩化ナトリウムまたは塩化カリウムよりなる反応層を形成せしめたものである請求項2記載のバイオセンサによる濃度測定方法。

【請求項4】 検量線データーを記憶させた測定器により、目的物質濃度の測定が行われる請求項1記載のバイオセンサによる濃度測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオセンサによる濃度測定方法に関する。更に詳しくは、pH補正が行われたバイオセンサによる濃度測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】バイオセンサに使用される酵素または微生物の活性(出力)は、pHによって大きく左右される。例えば、酵素としてグルコースオキシダーゼを用いた場合には、好適なpH範囲は4～6の範囲にあり、アルカリ性側もしくは極端な酸性側では酵素活性は急激に低下する。このため、従来のバイオセンサにあっては、サンプルのpHがある程度一定の場合は別として、サンプルを緩衝液で希釈したり、あるいは緩衝塩を基板上またはその周辺に担持させるなどの方法がとられている。しかしながら、このような方法では、サンプルpHの影響を十分に排除することは不可能である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、バイオセンサを用いる濃度測定方法において、サンプルpHの影響を補正によって排除し、正確な目的物質濃度を測定し得る方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】かかる本発明の目的は、同一の絶縁性基板上にpHセンサ用電極およびバイオセンサ用電極を設け、pHセンサ用電極で得られたpHでバイオセンサ用電極の検量線を選定し、目的物質濃度を測定することによって達成される。

【0005】

【発明の実施の形態】セラミックス、ガラス、プラスチック、紙、生分解性材料(例えば、微生物生産ポリエテル等)などの絶縁性基板上には、バイオセンサ用電極を構成する作用極および対極あるいは作用極、対極およ

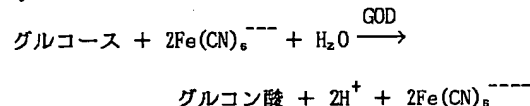
2

び参照極が設けられる。作用極、対極および参照極リードは、スクリーン印刷法、蒸着法、スパッタリング法などによって白金、金、銀、パラジウム、カーボン等から形成され、参照極は参照極リード上にスクリーン印刷法、蒸着法、スパッタリング法、フィルム貼付け法などによって一旦銀電極を形成させた後、定電流電解する方法あるいは塩化第2鉄水溶液中に浸漬する方法、更にはスクリーン印刷法によって塩化銀を塗布、積層させる方法などによって形成される。その後、各電極の中央部分が樹脂製絶縁膜などによって被覆される。なお、参照極を設けない2電極構造のものとすることもできる。

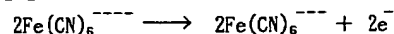
【0006】一般に、作用極上および対極上には酸化還元酵素および電子伝達体の混合物層の形成が行われ、参照極を設けた場合にはその上にも混合物層の形成が行われる。酸化還元酵素としてはグルコースオキシダーゼ(GOD)、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ等が、また電子伝達体としてはフェリシアン化カリウム、パラベンゾキノン、フェロセン等が一般に用いられる。

【0007】グルコースがGODの作用により酵素の存在下で酸化されてグルコノラクトンを生成させ、そのとき発生する H_2O_2 を作用極上で酸化し、その際の酸化電流値を測定することにより、グルコース濃度を間接的に求める方法は周知である。しかしながら、測定液が水で希釈されない原液サンプルの場合には、酸化反応が溶存酸素濃度に律速されるため、グルコース濃度が約100mg/dl程度迄しか直線検量範囲を示さない。そして、例えば使い捨てグルコースバイオセンサなどにあっては、多くの場合原液サンプルについての測定が行われる。

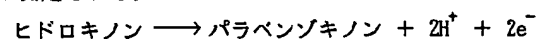
【0008】そこで、溶液中濃度が有限である酸素の代わりに、電子伝達体(メディエータ)がGOD等と共に用いられる。メディエータがフェリシアン化カリウム $K_3Fe(CN)_6$ の場合、この反応は次のように進行する。



この際発生したフェロシアンイオンは、作用極で酸化されて酸化電流を生ずる。



【0009】また、メディエータとしてフェリシアン化カリウムの代わりにパラベンゾキノンをを用いた場合には、GOD存在下でのグルコースとパラベンゾキノンとの反応でヒドロキノンが生成し、この際生成したヒドロキンは作用極で酸化され、酸化電流を生ずるのでその値が測定される。



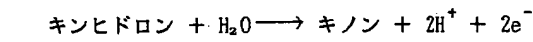
【0010】これらの各電極上への混合物層の形成は、水1ml当りGOD約1～50mg、好ましくは約1～20mg(165800

(3)

単位の場合) およびパラベンゾキノン約1~200mg、好ましくは約50~180mgまたはフェリシアン化カリウム約1~100mg、好ましくは約10~60mgを溶解させた水溶液約0.5~10 μ l、好ましくは約0.5~3 μ lを滴下法、スピンコート法などによって作用極上に滴下することによって行われ、そこに約0.05~10 μ m、好ましくは約0.1~2 μ mの膜厚の混合物層を形成させる。なお、この溶媒としてはアルコール、アルコール水溶液等も用いられる。

【0011】かかるバイオセンサ用電極を形成させた絶縁性基板には、pHセンサ用電極も同時に設けられる。pHセンサ用電極としては、アンチモン電極、金属酸化物電極、イオン感受性電界効果型トランジスタ (ISFET)、ガラス電極等を用いることもできるが、好ましくはキンヒドロンの電極が用いられる。

【0012】キンヒドロンの電極の場合、キンヒドロンの(キノン-ヒドロキノン等分子化合物)が水に溶解すると、次のような反応が起こる。



従って、平衡電極電位(酸化還元電位)Eは、

$$E = E^0 - 2.303RT [\text{pH}] / 2F$$

E^0 : 標準電極電位

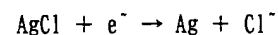
F: ファラデー定数

となり、測定液中の水素イオンに対して可逆的に応答することから、pHセンサとして使用することができる。

【0013】ここでは参照極として銀/塩化銀電極が用いられるが、カーボン作用極との間の端子間電圧を測定する際に、微小の電流が流れる必要がある。そのため、電荷の担い手である塩化物の存在が必要となる。塩化物としては、イオンの移動度との関係から塩化ナトリウムおよび塩化カリウムが用いられ、皮膚との接触によるかぶれを予防する上からは塩化ナトリウムの使用が望ましい。

【0014】塩化物層の形成は、参照極上ばかりではなく、作用極上あるいはこれら両方の電極上に行うこともできる。具体的には、キンヒドロンの層上に塩化物水溶液を添加することにより、キンヒドロンの層と塩化物との混合物層として形成され、それらの量はキンヒドロンの層にあっては約0.1~20mM、好ましくは約0.5~5mMであり、塩化物にあっては約1~2000mM、好ましくは約10~100mMであり、かつ塩化物がキンヒドロンの層に対して約2~200、好ましくは約2~20のモル比となるような量である。

【0015】かかる塩化物存在下での銀/塩化銀電極および平衡電極電位は次の如くであり、サンプルのpHは、このような両電極間の電位差を測定することによって求められる。



$$E = E^0 - 2.303RT \log [\text{Cl}^-] / F$$

【0016】バイオセンサ用電極部分およびpHセンサ用電極部分の個々の形成はこのようにして行われるが、これらを同一絶縁性基板上で複合化させる場合には、例え

4

ば次のようにして行われる。まず、同一絶縁性基板上にpHセンサ用のカーボン電極およびカーボンリードの銀電極を対向電極として設けると共に、バイオセンサ用電極として1対のカーボン電極を対向電極として設け、銀電極表面を塩化銀化して塩化銀/銀参照極とする。次いで、pHセンサ用対向電極上にキンヒドロンの水溶液を滴下し、乾燥させた後塩化ナトリウム水溶液を滴下して反応層を形成させる。また、バイオセンサ用の作用極上には酵素-メディエータ混合物水溶液を滴下し、乾燥させて、混合物層を形成させる。

【0017】このようにして形成されるバイオセンサを用いての目的物質濃度の測定は、目的物質がグルコースの場合、次のようにして行われる。

(1) まずpHを測定し、次いでグルコース濃度依存の出力電流を測定して、測定pHを合わせたグルコース値を出力、表示させる

(2) pHとグルコース濃度依存の出力電流とを同時に測定して、測定pHに合わせたグルコース値を出力、表示させる

(3) グルコース濃度依存の出力電流を先に測定し、その後pHを測定して、測定pHに合わせたグルコース値を出力、表示させる

【0018】これらの測定方法にあつては、まずpH検量線および各pHに応じたグルコースセンサの検量線を測定器回路中に記憶させておき、測定pHに応じた検量線を測定器中で選択させ、グルコース濃度依存の出力電流値を選択した検量線に適合させ、グルコース濃度を出力、表示させることが行われる。このとき、測定pH値を同時に出力、表示してもよい。

【0019】なお、pHの測定では、滴下1分後の電位値をpH依存出力電位とした。また、グルコース濃度の測定では、このようにして作製されたグルコースバイオセンサに所定濃度のグルコース水溶液を滴下して約5~180秒間程度反応させた後、そこに約0.05~1.0V、好ましくは約0.5~0.7Vの電圧を印加し、例えば印加10秒後の電流値をグルコース濃度依存出力電流値とした。測定には、ポテンショガルバナスタットおよびファンクションジェネレータが用いられる。

【0020】

【発明の効果】本発明方法により、バイオセンサ出力に与えるサンプルpHの影響を補正し、正確な目的物質濃度測定値を得ることができるので、食品製造工程中のグルコース管理、醗酵研究などの場で有効に用いることができる。

【0021】このpH補正式バイオセンサは、グルコースバイオセンサばかりではなく、アルコールバイオセンサ、乳酸バイオセンサ、ビルビン酸バイオセンサ、BODバイオセンサ等にも有効に適用される。

【0022】

【実施例】次に、実施例について本発明を説明する。

(4)

5

【0023】実施例

ポリエチレンテレフタレート基板上に、pHセンサ用のカーボン電極およびカーボンリードの銀電極各1本を、またグルコースセンサ用電極としてカーボン電極を2本(対極および作用極)を、それぞれスクリーン印刷法によって形成させた。そして、銀電極を参照電極とするために、0.1M塩化第2銀水溶液5 μ lを銀電極上に滴下し、1時間室温に放置した後水洗し、その後一夜空气中に放置して、銀電極表面を塩化銀化した。

【0024】濃度200mg/dlのキンヒドロロン水溶液を、pHセンサ用のカーボン作用極および塩化銀/銀参照極の両者にかかるように10 μ l滴下し、室温に1時間放置した後、50mM塩化ナトリウム水溶液をこれら両電極にかかるように滴下、乾燥させて、pHセンサ用電極上に反応層を形成させた。

6

*【0025】また、水1mlに対してグルコースオキシダーゼ(165800U/g)10mgおよびフェリシアン化カリウム48mgの割合で溶解させた水溶液1.5 μ lを、グルコースセンサ用作用極上に滴下し、室温で乾燥させて、グルコースバイオセンサを形成させた。

【0026】グルコース濃度0、200、400、600、800または1000mg/dlのサンプル液をpH4、5、6、7または8毎に調製し、総量50 μ lの各サンプル液を、pHセンサおよびグルコースセンサの両方にかかるように滴下し、各pH毎のグルコース濃度依存出力電流値を測定し、グルコース検量線を選定した。

【0027】この場合、サンプル液滴下後80秒間静置し、次いで2極間に0.6Vの電圧を印加し、印加10秒後の電流値をグルコース濃度依存出力電流値とした。

*

pH	グルコース濃度 (mg/dl)					
	0	200	400	600	800	1000
4	1	17	34	50	61	76
5	1	17	34	48	61	76
6	1	16	30	43	55	66
7	1	15	28	42	54	65
8	1	14	26	41	53	64

【0028】また、グルコース濃度が0である水の場合の各pHに対する電位を測定し、pH検量線とした。この場合、水の滴下1分後の電位値を、pH濃度依存出力電位とした。

pH	測定電位 (mV)
4	165
5	105
6	48
7	-15
8	-70

【0029】次いで、これらのデーターを別途製作した

pH補正グルコース測定器に記憶させた。

【0030】グルコース濃度300mg/dl、pH5のサンプル液について、その50 μ lを両センサにかかるように滴下し、測定器の表示結果を求めた。得られた結果(n=5)は、実施例として示される。なお、センサは、1サンプル液毎に使い捨てとした。また、pH7の条件で、グルコース検量線しか記憶していない測定器を用いた結果が、比較例として併記されており、そこでは実際の濃度より高めの表示がなされている。

実施例：300、298、302、300、299 (平均)300mg/dl
比較例：362、365、360、361、363 (平均)362mg/dl